

# Efek flavonoid daun srikaya (*Annona squamosa* (L)) terhadap pemacuan ekspresi p53 sel HeLa

*By* Laela Hayu Nurani Laela Hayu Nurani

## Efek flavonoid daun srikaya (*Annona squamosa* (L)) terhadap pemacuan ekspresi p53 sel HeLa

### Effects of flavanoids from *Annona squamosa* Leaves on the p53 expression of HeLa cell line

Laela Hayu Nurani<sup>1\*</sup>, Suwidjiyo Pramono<sup>2</sup>, Sudjadi<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Fakultas Farmasi Universitas Ahmad Dahlan Yogyakarta

<sup>2</sup>Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta

#### Abstrak

Flavonoid merupakan metabolit sekunder yang mempunyai berbagai aktivitas diantaranya sebagai antikanker dan antioksidan. Daun srikaya (*Annona squamosa* L.) dilaporkan mengandung flavonoid. Isolasi flavonoid dilakukan dari fraksi eter yang dipisahkan dengan kromatografi kertas dengan fase gerak asam asetat 15%. Empat flavonoid dengan harga Rf 0,11, 0,23, 0,46 dan 0,78 terdeteksi berturut-turut sebagai 5-hidroksi-7-R-flavonol (1), 5,3',4'-trihidroksi-7-R-flavonol (2), 5-hidroksi-7-R-flavanon (3) dan 7-R-flavanon (4). Uji sitotoksitas terhadap setiap flavonoid pada sel HeLa dilakukan dengan metoda perhitungan langsung, sedang uji ekspresi p53 dengan metode imunositokimia. Hasil menunjukkan bahwa LC<sub>50</sub> flavonoid 1, 2, 3, dan 4 adalah 12.63±3.4, 18.47±3.4, 75.74±6.2 dan 204.4±14.0 ug/mL, 12 ug/mL 5-hidroksi-7-R-flavonol (1) menaikkan ekspresi p53 sebelas kali lebih tinggi daripada kontrol negatif.

**Kata kunci:** *Annona squamosa*, HeLa, flavonoid, p53.

#### Abstract

Flavonoid are secondary metabolites with many activities such as an anticancer and antioxidant. *Annona squamosa* L. leave are reported to contain flavonoids. *Annona squamosa* flavonoids were isolated from ether fraction and separated by paper chromatography with acetic acid 15% as mobile phase. Four flavonoids with the Rf value of 0.11, 0.23, 0.46 and 0.78 were detected as 5-hydroxy-7-R-flavonol (1), 5,3',4'-trihydroxy-7-R-flavonol (2), 5-hydroxy-7-R-flavanone (3) and 7-R-flavanone (4), respectively. The cytotoxicity assay of each flavonoid on HeLa cell line was carried out using direct counting method, whereas the determination of p53 expression was done using immunocytochemistry. The result showed that LC<sub>50</sub> of flavonoid 1, 2, 3 and 4 were 12.63±3.4, 18.47±3.4, 75.74±6.2 and 204.4±14.0 ug/mL, respectively. Moreover, 12 µg/mL of 5-hydroxy-7-R-flavonol (1) increased p53 expression eleven fold than that of control.

**Keywords:** *Annona squamosa*, HeLa, flavonoid, p53

#### Pendahuluan

Prevalensi kanker serviks menempati urutan yang tertinggi di Indonesia diikuti dengan kanker payudara (Tjindarbumi and Mangunkusumo, 2002). Pengujian senyawa terhadap antikanker serviks dapat menggunakan model *cell line* HeLa yang merupakan sel epitel kanker leher rahim manusia. Kanker

serviks ini dapat terjadi karena infeksi Human Papilloma Virus (HPV). Terdapat dua kelompok HPV yaitu kelompok yang memberikan resiko tinggi terhadap keterjadian kanker serviks (HPV16, 18, 31, dan 33) serta yang memberi resiko rendah (HPV 6, 11, dan 13) (Baege *et al.*, 2002).

Terjadinya kanker serviks oleh pengaruh HPV18 melalui over ekspresi protein E6 dan E7 (Nishimura *et al.*, 2006). Protein ini merupakan protein supresor yang berpengaruh pada apoptosis. E6 akan berikatan dengan p53 yang merupakan tumor supresor gen sehingga peran p53 menjadi hilang atau berkurang. Hal ini mengakibatkan sel tidak mengalami apoptosis dan dapat memacu terjadinya proliferasi sel. E7 berikatan dengan pRB sehingga terjadi pelepasan E2F yang merupakan faktor transkripsi yang berperan dalam terjadinya siklus sel (Teissier *et al.*, 2010).

Flavonoid merupakan metabolit sekunder yang mempunyai banyak aktivitas diantaranya adalah antikanker. Beberapa flavonoid dilaporkan mempunyai aktivitas antikanker. Quercetin dan apigenin dapat memacu siklus sel dan apoptosis pada sel HeLa dengan pemacuan p53 dan penghambatan NF- $\kappa$ B (Priyadarsini *et al.*, 2010). Fisetin juga dapat mengblok siklus sel pada G0/G1 dan memacu aktivitas p53 serta p21 pada sel T24 dan EJ (Li *et al.*, 2010; Khan *et al.*, 2008).

Analisis kimia struktur flavonoid menunjukkan bahwa aktivitas antikanker disebabkan adanya gugus  $\alpha,\beta$ -unsaturated carbonyl dalam struktur flavon. Senyawa dengan struktur  $\alpha,\beta$ -unsaturated carbonyl mempunyai efek antikanker dan sitotoksik melalui alkilasi Michael. Dilaporkan juga bahwa gugus parahidroksi berpotensi sebagai antioksidan, gugus keton dan ikatan rangkap terkonjugasi memiliki aktivitas antiinflamasi, antikanker dan antitumor dan berpeluang sebagai agen obat baru (Amslinger, 2010).

Dilaporkan juga bahwa struktur flavonoid mempunyai keistimewaan dengan delokalisasi elektron yang tinggi sehingga berpotensi sebagai antioksidan (Cos *et al.*, 2000). Struktur flavonoid dengan adanya gugus hidroksi pada C<sub>3</sub> dan adanya ikatan rangkap pada rantai C bagian kerangka piran dapat meningkatkan aktivitas sistem imun. Efek antitumor disebabkan adanya ikatan langsung dengan DNA dan sintesis protein atau penghambatan protein kinase atau meningkatkan respon imun (Amslinger, 2010).

Daun Srikaya mempunyai kandungan kimia asam oleat (Intaranongpai *et al.*, 2006), polyhidroxybis acetogenins (Kazua *et al.*, 1993),

quercetin-3-O-glucoside (Panda and Kar, 2007). Aktivitas yang dilaporkan dari daun srikaya adalah antioksidan (Shirwaikar *et al.*, 2004), antidiabetes (Panda and Kar, 2007), dan secara *in vitro* mempunyai aktivitas sitotoksik (Biva *et al.*, 2009). Namun demikian mekanisme sitotoksik maupun antikanker secara spesifik belum dikaji lebih jauh, sehingga perlu penelitian mekanisme aksi antikankernya.

## Metodologi

### Bahan dan alat

Bahan utama yang digunakan pada penelitian ini adalah daun Srikaya yang diambil dari daerah Timoho, Yogyakarta pada bulan Februari 2009. Bahan lain yang digunakan adalah akuades, HCl, eter, HeLa *cells line* (koleksi Lab. Parasit Fakultas Kedokteran UGM), media RPMI, penstrep, dan antibodi p53. Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah panci infusa, labu alas bulat, pendingin balik, penangas, plate, flask, conical, Laminair Air Flow, hemocytometer, poly-l-lysin.

### Jalannya Penelitian

#### Isolasi flavonoid Srikaya

Isolasi flavonoid diawali dengan pembuatan infusa, kemudian dilakukan evaporasi sampai diperoleh ekstrak kental. Ekstrak kemudian dihidrolisis dengan HCl dan dipanaskan, kemudian dilakukan fraksinasi menggunakan eter. Fraksi eter kemudian dipisahkan dengan kromatografi kertas preparative menggunakan fasa gerak asam asetat 15% sehingga diperoleh empat pita pemisahan. Pita tersebut kemudian dilarutkan dalam methanol dan diuapkan sehingga diperoleh Flavonoid 1, 2, 3, dan 4 (Nurani, 2004).

#### Uji Sitotoksitas terhadap sel HeLa

Uji Sitotoksitas dilakukan dengan metode *direct counting*. Uji sitotoksitas dilakukan pada microplate 96 sumuran terhadap biakan sel yang diberi perlakuan senyawa uji berbagai kadar. Jumlah sel yang hidup dihitung menggunakan alat *baemocytometer* dibawah mikroskop cahaya. Hasil perhitungan diubah kedalam prosen kematian selanjutnya dianalisis dengan analisis probit untuk mendapatkan LC<sub>50</sub>.

#### Uji pemacuan ekspresi p53 sel HeLa akibat perlakuan flavonoid daun Srikaya

Uji imunositokimia dilakukan dengan menghitung jumlah ekspresi p53 sel HeLa dibandingkan dengan jumlah keseluruhan sel setelah diberi perlakuan zat uji dengan konsentrasi dibawah LC<sub>50</sub>. Ekspresi positif ditandai dengan warna coklat atau yang lebih gelap pada sitoplasma dibandingkan dengan yang lain.

Tabel I. Persen kematian sel HeLa oleh flavonoid **1**, **2**, **3**, dan **4** daun *Annona squamosa* (n = 3)

Kadar ( $\mu\text{g/mL}$ )	Persen kematian sel HeLa oleh Flavonoid			
	1	2	3	4
20	$49 \pm 4,0$	$48 \pm 2,6$	$33 \pm 3,0$	$8 \pm 32$
40	$59 \pm 4,3$	$52 \pm 3,0$	$38 \pm 3,0$	$13 \pm 2,6$
78	$74 \pm 5,0$	$68 \pm 4,0$	$43 \pm 3,6$	$47 \pm 3,0$
156	$76 \pm 5,0$	$70 \pm 4,0$	$56 \pm 3,6$	$59 \pm 3,0$
313	$77 \pm 5,0$	$79 \pm 4,6$	$66 \pm 4,3$	$60 \pm 4,3$
625	$78 \pm 5,3$	$91 \pm 5,0$	$71 \pm 5,0$	$64 \pm 4,0$
1250	$85 \pm 6,0$	$96 \pm 5,0$	$90 \pm 5,0$	$76 \pm 5,0$

Tabel II. Harga  $\text{IC}_{50}$  Flavonoid **1**, **2**, **3**, dan **4** dari daun *Annona squamosa* (n = 3)

Flavonoid	$\text{LC}_{50}$
<b>1</b>	$12,02 \pm 3,4$
<b>2</b>	$18,47 \pm 3,4$
<b>3</b>	$75,74 \pm 6,2$
<b>4</b>	$204,40 \pm 14,0$

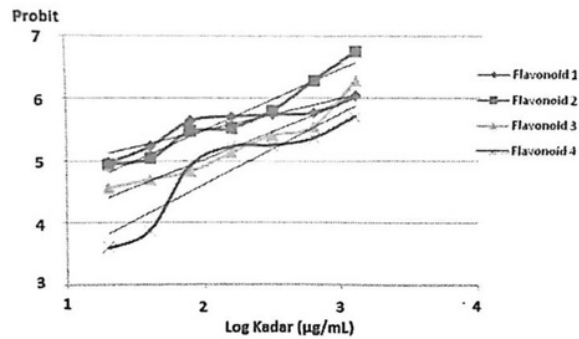
## HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil isolasi flavonoid Srikaya diperoleh sejumlah 4 flavonoid. Flavonoid **1**, **2**, **3**, dan **4** berturut-turut adalah flavonoid **1** merupakan senyawa 5'-hidroksi-7-R-Flavonol, Flavonoid **2** adalah 5',3',4'-trihidroksi- 7-R-Flavonol, Flavonoid **3** adalah 5-hidroksi-7-R-Flavanon, dan Flavonoid **4** adalah 7-R-Flavanon (Nurani, 2004). Pengujian sitotoksik dilakukan terhadap keempat flavonoid dan selanjutnya flavonoid paling aktif dilihat pengaruhnya terhadap ekspresi p53 sel HeLa.

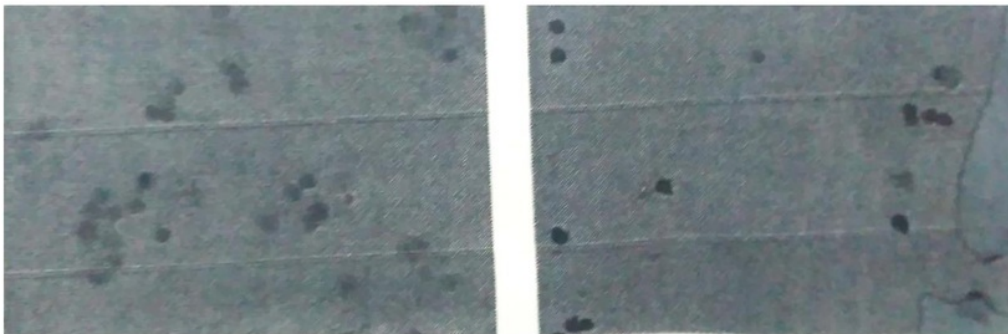
Uji sitotoksitas dilakukan untuk mengetahui toksisitas senyawa flavonoid daun Srikaya terhadap sel-sel kanker. Sifat sitotoksik dinyatakan dengan harga  $\text{LC}_{50}$ . Makin kecil  $\text{LC}_{50}$  berarti semakin besar sifat ketoksikannya. Pada penelitian ini uji sitotoksik dilakukan dengan metode penghitungan langsung. Persen kematian sel dihitung langsung berdasar perbedaan morfologi sel hidup dan sel mati yang dibandingkan dengan kontrol. Data persen kematian oleh pengaruh flavonoid dari daun srikaya pada tabel I.

Kematian sel HeLa berkorelasi positif dengan perubahan konsentrasi flavonoid (Gambar 1). Semakin besar konsentrasi isolat semakin besar persentase kematian sel HeLa. Penentuan  $\text{LC}_{50}$  menggunakan analisis Probit yang didasarkan pada grafik fungsi linier log kadar vs nilai probit prosentase kematian sel HeLa akibat pemberian flavonoid. Dari grafik hubungan Log kadar isolat **1** vs Probit memberikan hasil persamaan seperti terlihat pada Tabel II. Harga  $\text{LC}_{50}$  yang diperoleh terhadap sel HeLa oleh pengaruh Flavonoid **1**, **2**, **3**, dan **4** berturut-turut sebesar Flavonoid **1**:  $12,02 \pm 3,4$ ; Flavonoid-**2**:  $18,47 \pm 3,4$ ; Flavonoid-**3**:  $75,74 \pm 6,2$ ; dan Flavonoid-**4**:  $204,40 \pm 14,0$  (Tabel II).

Flavonoid-**1** mempunyai struktur  $\alpha, \beta$ -unsaturated carbonyl seperti halnya Flavonoid **2** dan **3**. Flavonoid-**4** merupakan senyawa golongan flavan sehingga tidak memiliki ikatan rangkap di kedudukan C2 dan C3. Hal ini berpengaruh pada aktivitas sitotoksik dari Flavonoid **1** mempunyai aktivitas sitotoksik yang lebih tinggi dibandingkan dengan



Gambar 1. Kurva hubungan log kadar flavonoid **1**, **2**, **3**, dan **4** dari daun *Annona squamosa* terhadap Probit dari persen kematian sel HeLa.



Gambar 2. Ekspresi p53 Sel Hela. (A) kontrol negatif (hanya diberi pelarut) dan (B) dengan penambahan flavonoid **1** dengan kadar 12 µg/mL daun *Annona squamosa*.

Tabel III. Ekspresi p53 sel HeLa oleh pengaruh flavonoid **1** daun *Annona squamosa* L. diperoleh dari jumlah sel yang terekspresi dibagi jumlah sel keseluruhannya baik yang terekspresi dan yang tidak.

Perlakuan	Ekspresi p53
Kontrol negatif	7,06 ± 0,53
Kadar 12 µg/mL	87,28 ± 5,61

Flavonoid yang lain. Selain itu, jumlah atom OH juga berpengaruh terhadap efek antikanker melalui mekanisme antioksidan.

Konsentrasi senyawa uji yang digunakan pada uji imunositokimia adalah konsentrasi yang kecil dibawah LC<sub>50</sub>. Pengujian imunositokimia dilakukan terhadap ekspresi p53 sel HeLa oleh pengaruh flavonoid dengan harga LC<sub>50</sub> terendah yaitu Flavonoid **1** dengan hasil seperti pada gambar 2. Dilaporkan oleh Khan *et al.*, 2008 bahwa flavonoid mampu memperbaiki

sel kanker dengan meningkatkan *tumour suppressor* gen (p53).

Gen p53 dapat menghambat perkembangan tumor dengan meningkatkan sensitivitas proliferasi sel-sel abnormal terhadap apoptosis (Zhang *et al.*, 2006). Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian Flavonoid-**1** kadar 12 µg/mL mampu meningkatkan ekspresi p53 sebesar 87,28±5,61, sedangkan pada kontrol negatif ekspresi p53 hanya sebesar 7,06±0,53 seperti tersaji pada Tabel III.



Berdasarkan hasil ini maka aktivitas infusa daun srikaya dapat ditelusuri mekanismenya melalui aktivitas kandungan aktifnya sebagai antikanker pada kanker serviks melalui mekanisme pemancuan p53. Dengan peningkatan ekspresi p53 maka diharapkan akan terjadi mekanisme apoptosis pada sel kanker dengan pemberian daun srikaya.

Molekul pengatur yang sangat penting dalam siklus sel salah satunya adalah gen p53 yang juga disebut *guardian of the cell* (Sofyan, 2007). Pemancuan p53 oleh flavonoid dapat dijelaskan oleh analisis kimia struktur flavonoid. Aktivitas antikanker disebabkan adanya gugus  $\alpha,\beta$ -unsaturated carbonyl dalam struktur flavonol atau flavonol. Senyawa dengan struktur  $\alpha,\beta$ -unsaturated carbonyl bias mempunyai efek antikanker melalui alkilasi Michael (Amslinger, 2010). Flavonoid 1 yang merupakan turunan flavonol dengan 5 OH dan tersubstitusi pada posisi 7 sangat relevan untuk ditentukan

struktur kimianya secara lengkap dan diteliti aktifitas antikanker secara *in vivo*.

## Kesimpulan

Flavonoid daun *Annona squamosa* mempunyai aktivitas sitotoksik terhadap sel HeLa dengan  $LC_{50}$  untuk Flavonoid 1, 2, 3, dan 4 berturut-turut sebesar  $12,02 \pm 3,4$ ;  $18,47 \pm 3,4$ ;  $75,74 \pm 6,2$ ; dan  $204,40 \pm 14,0$   $\mu\text{g/ml}$ . Flavonoid 1 daun *Annona squamosa* mempunyai aktivitas pemacuan terhadap ekspresi p53 sel HeLa sebesar  $87,28 \pm 5,61$  sedangkan control negatif sebesar  $7,06 \pm 0,53$

## Ucapan Terima Kasih

terimakasih disampaikan kepada Lembaga Penelitian dan Pengembangan UAD atas Dana Penelitian Tahun 2010

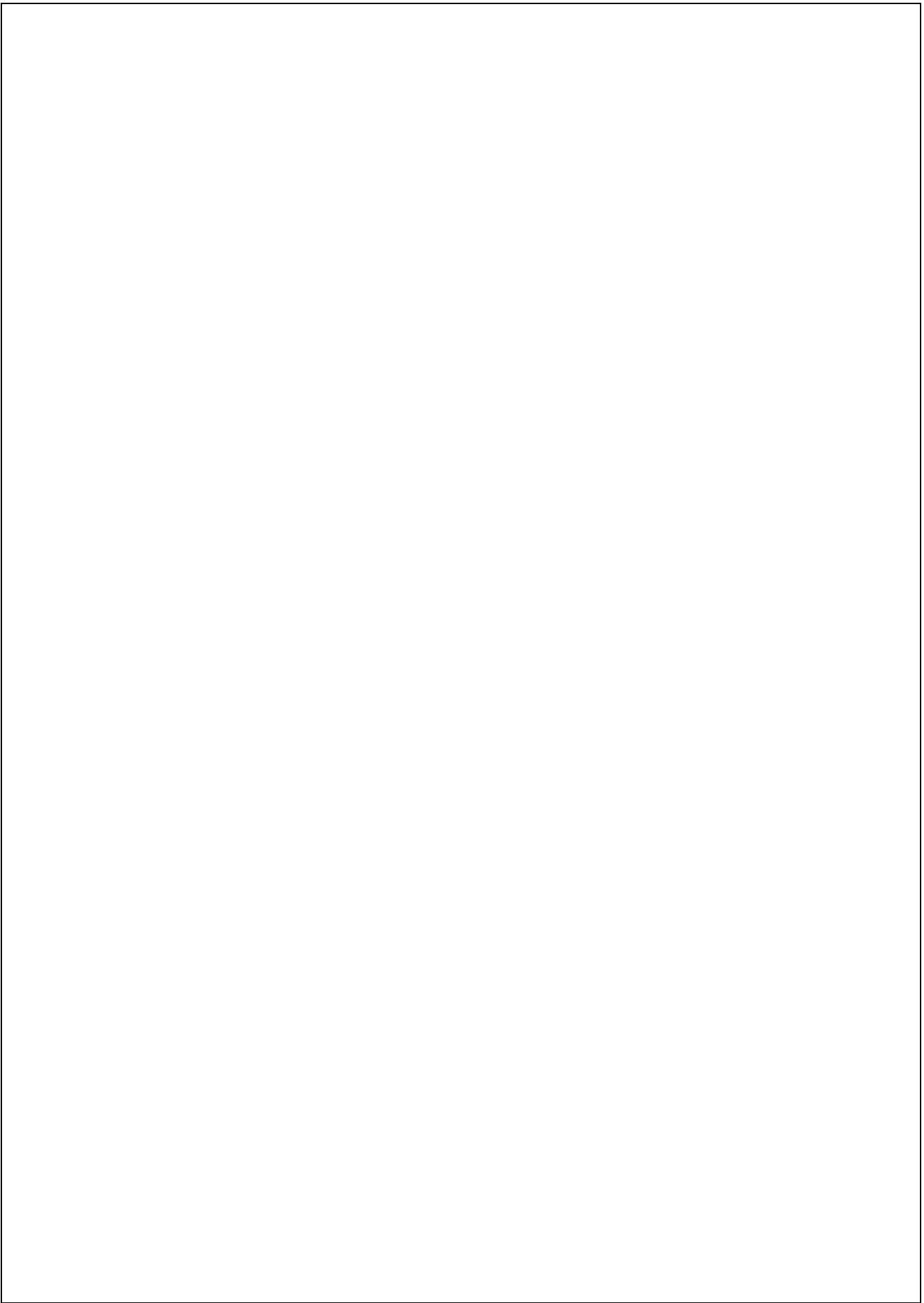
## Daftar Pustaka

- Amslinger, 2010, The Tunable Functionality of  $\alpha,\beta$ -Unsaturated Carbonyl Compounds Enables Their Differential Application in Biological Systems, *ChemMedChem*, 5(3)351-356
- Baege, A.C., Berger, A., Schlegel, R., and Veldman, T., 2002, Cervical Epithelial Cells Transduce with the Papillomavirus E6/E7 Oncogenes Maintain Stable Levels of Oncoprotein Expression but Exhibit Progressive, Major Increases in Htert Gene Expression and Telomerase Activity, *Am J. Pathol.* 160(4), 1251-1257
- Biva, I.J., Vhuayan, M.M.I., Saha, M.R., Islam, M.S., and Shammy Sarwan, S., 2009, In-vitro Antioxidant and Cytotoxicity Studies of *Annona squamosa* Linn, *S.J. Pharm. Sci.*, 2(0) 32-36
- Cos, P., Calomme M, Pieters, L, Vlietinck, A.J., and Berghe, V.D., 2000, Structure-activity relationship of flavonoids as antioxidant and pro-oxidant compounds, *Studies Natural Product Chemistry*, 22(3)307-341
- Khan, N., Afaq, F., Syed, D.N and Mukhtar, H. 2008, Fisetin. a novel dietary flavonoid, cause apoptosis and cellcycle arrest in human prostate cancer LNCaP cells. *Carcinogenesis* 29(5):1049-1056
- Kazua, H., Santoko, A., Reiko, Y., Uno, N., and Yoshinori, F., 1993, Structural studies polyhydroxybis acetogenins from *Annona squamosa* L. using combination of chemistry derivatisazion and precursor ion scanning mass spectrophotometry. *Org. Mass Spectrom*, 28(12)L 1516-1524
- Intaranongpai, J., Chavasiri, W., and Gritsanapan, W., 2006, Anti-head lice effect of *Annona squamosa* seeds, *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, 37(3): 532-535
- Li, J., Y Cheng, Y., W Qu, W., Y Sun, Y., Z Wang, Z., H Wang, H., B. and Tian, B., 2010, Fisetin, a Dietary Flavonoid, Induces Cell Cycle Arrest and Apoptosis through Activation of p53 and Inhibition of NF-Kappa B Pathways in Bladder Cancer Cells, *Basic Clin Pharmacol Toxicol*,

- Nishimura, A., Nakahara, T., Ueno, T., T., Sasaki, K., Yoshida, S., Kyo, S., Howley, P.M., and Sakai, H., 2006, Requirement of E7 oncoprotein for viability of Hela cells, *Microbes and Infection*, 8: 984-993
- Nurani, L.H., 2004, Isolasi dan identifikasi flavonoid infusa daun Srikaya (*Annona squamosa*, L) dan uji antiproliferasi terhadap sel HeLa, Thesis, Fakultas Farmasi UGM, Yogyakarta
- 3 Panda S., and Kar, A., 2007, Antidiabetic and antioxidative effects of *Annona squamosa* leaves are possibly mediated through quercetin -3-O-glucoside, *BioFactors*, 31:201-210
- Priyadarsini, RV., Murugan RS., Maitreyi, S., Ramalingam, K., Karunakaran, D., and Nagini, S., 2010, The flavonoid quercetin induces cell cycle arrest and mitochondria-mediated apoptosis in human cervical cancer (HeLa) cells through p53 induction and NF-Xb inhibition, *Eur J Pharmacol*, 649(1-3):84-91
- 4 Shirwaikar A, Rajendran K, and Kumar CD., 2004, In vitro 7 antioxidant studies of *Annona squamosa* Linn. Leaves, *Indian J Exp Biol*, 42(8):803-7
- Sofyan, R., 2000, Terapi kanker pada tingka 2 molekuler, *Cermin Dunia Kedokteran*, 127:5-10
- Teissier, S., Pang, C.L., and Thierry, F., 2010, The E2F5 repressor is an activator of E6/E7 transcription and of the S-phase entry in HPV18-associated cells, *Oncogene* 29(36):5061-70
- 5 Tjindarbumi, D., and Mangunkusomo, R., 2002, Cancer in Indonesia, Present and Future, *Jpn J Clin Oncol* ; 32 (Supplement 1) 17-21
- 1 Zhang, H.M., Yuan, J., Cheung, P., Chau, D., Wong, B.W., McManus, B.M., and Yang D., 2005, Gamma Interferon-Inducible Protein 10 Induces HeLa Cell Apoptosis through p53-Dependent Pathway Initiated by Suppression of Human Papillomavirus Type 18 E6 and E7 Expression, *Molecular and Cellular Biology*, 25(14):6247-6258.

---

\*)Korespondensi: Laela Hayu Nurani  
Fakultas Farmasi Univ. Ahmad Dahlan Yogyakarta  
Email: laelagrin@yahoo.com







# Efek flavonoid daun srikaya (*Annona squamosa* (L)) terhadap pemacuan ekspresi p53 sel HeLa

## ORIGINALITY REPORT

7%

## SIMILARITY INDEX

### PRIMARY SOURCES

1	<a href="https://etheses.whiterose.ac.uk">etheses.whiterose.ac.uk</a> Internet	45 words — 2%
2	<a href="http://www.imagenglobal.org">www.imagenglobal.org</a> Internet	24 words — 1%
3	<a href="https://membership.sciencepublishinggroup.com">membership.sciencepublishinggroup.com</a> Internet	24 words — 1%
4	Das, Niranjan; Nath, Jayasree and Dinda, Biswanath. "Antioxidant Phytochemicals from <i>Sida glutinosa</i> ", <i>Journal of Pharmacy Research</i> , 2012. Publications	19 words — 1%
5	<a href="https://docslide.us">docslide.us</a> Internet	18 words — 1%
6	<a href="https://digilib.uns.ac.id">digilib.uns.ac.id</a> Internet	17 words — 1%
7	<a href="https://repository.usu.ac.id">repository.usu.ac.id</a> Internet	15 words — 1%
8	<a href="https://repository.unpad.ac.id">repository.unpad.ac.id</a> Internet	14 words — 1%

